

Titration des anticorps contre le virus de la variole des dromadaires par la méthode de séroration des plaques sur des cellules IB-RS₂

par NGUYEN-BA-VY (1) et D. RICHARD (2)

Institut d'Elevage et de Médecine vétérinaire des Pays tropicaux - C.I.R.A.D.,
10, rue Pierre-Curie, 94704 Maisons-Alfort Cedex, France.

- (1) Laboratoire de Virologie.
(2) Service d'Alimentation-Nutrition.

RÉSUMÉ

NGUYEN-BA-VY, RICHARD (D.). — Titration des anticorps contre le virus de la variole des dromadaires par la méthode de séroration des plaques sur des cellules IB-RS₂. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1985, 38 (3) : 223-228.

Une méthode de séroration des plaques, sur des cellules IB-RS₂ en milieu liquide, a été mise au point et utilisée pour le titrage des anticorps contre le virus de la variole des dromadaires.

Un essai sur 57 sérums de dromadaires du Niger a révélé 43 positifs à des dilutions variant de 1/40 à 1/640 par millilitre.

Mots clés : Variole des dromadaires - Anticorps - Séroration des plaques - Cellules IB-RS₂.

SUMMARY

NGUYEN-BA-VY, RICHARD (D.). — Titration of camel pox antibody by plaque seroreduction on IB-RS₂ cells. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1985, 38 (3) : 223-228.

A plaque seroreduction method on IB-RS₂ cells, under liquid medium, has been perfected and used for the titration of camel pox antibody.

An assay on 57 camel sera of Niger has shown 43 positive sera with titres varying from 1/40 to 1/640 per millilitre.

Key words : Camel pox - Antibody - Plaque seroreduction - IB-RS₂ cells.

INTRODUCTION

La variole à orthopoxvirus des dromadaires africains est une maladie contagieuse et inoculable. Selon CURASSON (8), elle était connue depuis longtemps en Afrique et en Asie. Des formes graves avec hyperthermie, éruption variolique et complications secondaires ne se rencontrent souvent que chez les jeunes (4, 6, 7, 8, 14, 19), mais rarement sur des chamelons au-dessous de 6 mois qui bénéficieraient encore d'une immunité d'origine maternelle.

Les adultes, plus résistants, n'ont montré pour certains que des symptômes frustes avec des lésions localisées et une perte de conditions économiques (4, 8, 14, 20).

Cette enzootie, qui apparaît en saison des pluies ou en saison sèche et froide, ne suit pas obligatoirement le rythme annuel. Son éclosion, qui peut être espacée de 1 à 5 ans, dépend essentiellement de l'état d'immunité des animaux d'une région. Peut-on évaluer ce degré de résistance en ayant recours à des méthodes sérologiques ? La méthode de séro-

réduction des plages a été employée pour déceler de faibles titres d'anticorps contre des poxvirus (9, 12, 13).

Nous relatons, dans cet article, les résultats des essais d'une technique de séroration des plages sur des cellules IB-RS₂ et de son application aux titrages des anticorps contre le virus de la variole des dromadaires.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

La souche IB-RS₂ (11) de cellules rénales de porc est cultivée avec un mélange à égal volume des milieux 199 et Stoker, additionné de 10 p. 100 de bouillon tryptose phosphate (Difco) et des antibiotiques (pénicilline 100 U.I./ml et kanamycine 50 µg/ml). Ce milieu de culture contient 3 p. 100 de sérum fœtal bovin ou 10 p. 100 de sérum de veau inactivé, dépourvu d'inhibiteurs. Le milieu d'entretien n'a que 0,5 p. 100 de sérum fœtal.

Lors des titrages, on prépare des nappes de cellules en distribuant 1 ml d'une suspension de 2×10^5 cellules à chaque cupule des plaques (*).

Souche de virus

Une souche de virus de la variole des dromadaires (orthopoxvirus), dénommée VD₄₇, a été isolée et identifiée à Maisons-Alfort par NGUYEN-BA-VY et RICHARD (17), à partir des lésions prélevées sur des dromadaires (*Camelus dromedarius*) du Niger.

Un stock de ce virus a été constitué à partir d'une culture sur des cellules IB-RS₂ ; la suspension récoltée après la généralisation des lésions cytopathiques est soumise à 3 congélations-décongélations ou un traitement aux ultrasons, avant d'être clarifiée par centrifugation et conservée à - 30 °C.

Titrage du virus

La suspension de virus, diluée avec du milieu d'entretien selon la progression géométrique de raison 4, est ensemencée sur des nappes de cellules préformées, à raison de 0,05 ml par cupule et dans 3 cupules par dilution. Après une incubation de 2 heures à 36 °C dans une étuve à CO₂, on distribue à chaque cupule soit 1 ml du milieu d'entretien liquide, soit du

même milieu additionné de 1,6 p. 100 de carboxyméthylcellulose (2).

La lecture des résultats est effectuée après la fixation et la coloration des nappes cellulaires. Pour cela, on ajoute à chaque cupule, sans avoir éliminé son ancien milieu, une goutte de formaldéhyde (solution aqueuse à 37 p. 100). Après une fixation de 3 heures ou une nuit à la température du laboratoire pour inactiver tout virus, les cupules de cellules sont vidées et rincées à l'eau du robinet, puis colorées pendant 20 min avec une solution filtrée de violet de gentiane (identique à celle utilisée pour la coloration de Gram). Après un nouveau rinçage, chaque cupule reçoit 2 gouttes d'une solution de P.B.S. glycinée à 50 p. 100, pour avoir une meilleure conservation.

Sérums des dromadaires

Les sérums examinés proviennent des lots de sangs récoltés sur des dromadaires du Niger. Ils sont conservés à - 20 °C, jusqu'au moment de l'emploi.

Séroration des plages

Chaque sérum décomplémenté est dilué avec du milieu Stoker, selon la progression géométrique de raison 2, puis mélangé à égal volume avec une suspension de virus contenant de 1 000 à 1 200 U.F.P./ml.

Le témoin-virus est constitué d'une dilution à 1/2 de la suspension virale.

Les témoins-sérums sont des dilutions à 1/4.

Tous ces mélanges sont incubés à 37 °C pendant 2 heures, avant d'être distribués à des tapis de cellules préformées, à la dose de 0,05 ml/cupule et dans 3 cupules par dilution. Il en est de même pour les différents témoins. Après 2 heures de contact dans une étuve à CO₂, chaque cupule reçoit 1 ml de milieu d'entretien, additionné ou non de carboxyméthylcellulose.

Avant la lecture des résultats, ces nappes de cellules sont fixées et colorées selon la méthode préconisée. Toute dilution sérique qui laisse subsister un nombre de plages égal ou inférieur à 50 p. 100 de celui des témoins-virus, est considérée comme positive.

Le titre d'un antisérum est l'inverse de la dilution-limite qui réduit au moins 50 p. 100 des plages par rapport aux témoins-virus.

Ce titre est celui de 0,10 ml d'antisérum, car si l'on n'a mis effectivement que 0,025 ml d'antisérum dilué dans chaque cupule, il n'y

(*) Plaque Nunclon à 24 cupulés, avec couvercle.

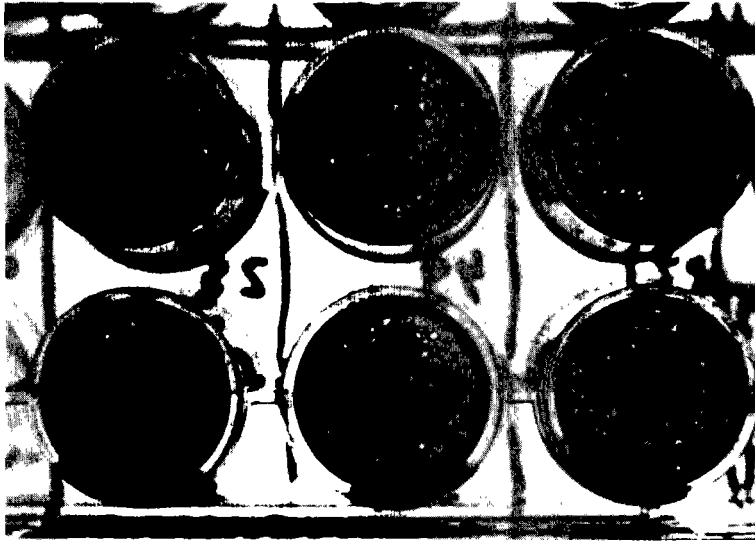


Photo 1. — Plages formées par le virus D47 sur des nappes de cellules IB-RS₂.

existe aussi que 0,025 ml de virus, c'est-à-dire 25 U.F.P. ; or, le pouvoir neutralisant d'un antisérum doit être calculé vis-à-vis de 100 U.F.P.

RÉSULTATS

Sensibilité des cellules IB-RS₂

Le virus de la variole des dromadaires s'est multiplié facilement sur des cellules IB-RS₂ avec apparition du pouvoir d'hémadsorption et de l'effet cytopathogène caractérisé par des

foyers de cellules arrondies et des syncytia. Ces cellules géantes, visibles d'abord sous forme de petites plages rondes ou ovalaires de 0,1 à 0,3 mm de diamètre, s'agrandissent progressivement pour atteindre 0,5-0,8 mm, au bout de 48 heures de culture à 36 °C. Ensuite, il y a apparition des plages satellites adjacentes aux primaires, puis des plages secondaires à distance. Les noyaux nécrosés des syncytia forment, vers le 3^e jour, des chapelets ou des grappes de corpuscules dans le vaste cytoplasme qui se vacuolise, se rétracte en travées ou en couronnes et finit par se décoller dans le milieu liquide. Les plages précoces produites

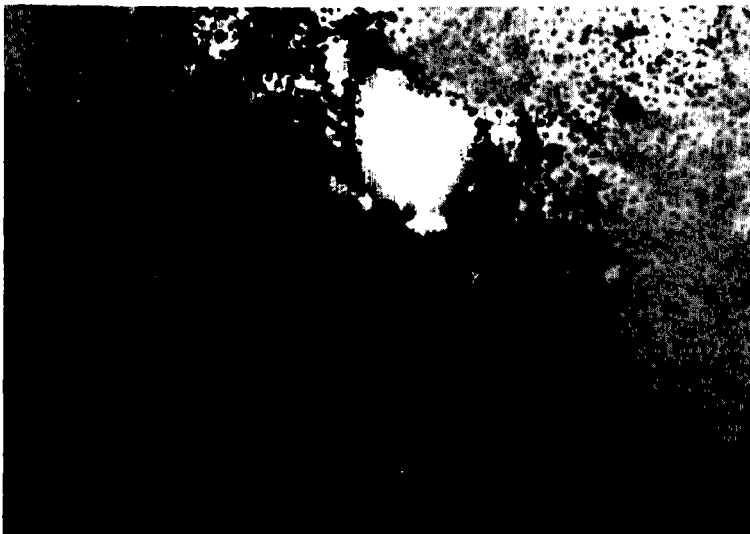


Photo 2. — Plage produite par la formation du syncytium.

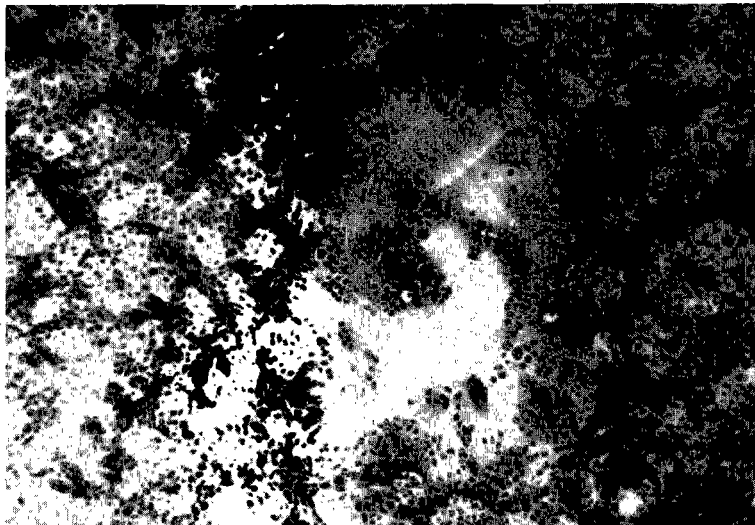


Photo 3. — Grande plage produite par la formation de plusieurs syncytia.

par ce virus ne sont donc pas dues à l'effet cytolytique, mais par la fusion cytoplasmique lors de la formation des syncytia.

La précocité des plages dépend de l'âge des cellules. Sur des couches de cellules jeunes de 24 heures, les premières plages se manifestent dès la 20^e heure après l'inoculation ; sur des couches de cellules âgées, elles demeurent invisibles durant plusieurs jours (photos 1, 2, 3).

Existence des inhibiteurs non spécifiques

Des inhibiteurs non spécifiques ont été trouvés au cours de nos essais sur 3 lots de sérums de bovin et 2 de cheval. Ceux-ci n'empêchent pas la multiplication du virus, mais ils retardent de 3 à 7 jours l'apparition des plages. Des sérums favorables à leur formation précoce ont dû être sélectionnés pour la culture et l'entretien des cellules destinées aux titrages.

Effet défavorable des hautes températures d'incubation

Différentes températures d'incubation variant de 36 °C à 41 °C ont été essayées : les cellules IB-RS₂ restent vivantes à 41 °C, mais aucune plage de virus ne s'est formée à 40 °C et 41 °C, au bout de 48 heures d'incubation. A 39 °C, il n'y a qu'une apparition très irrégulière et en nombre réduit de ces foyers. Les plages précoces ne sont trouvées qu'à 36 °C et 36,5 °C.

Usage du milieu d'entretien liquide

Une même suspension du virus VD₄₇ a été titrée en double exemplaire, sur des plaques de cellules IB-RS₂ ; le premier lot a reçu du milieu liquide, le second du même milieu additionné de 1,6 p. 100 de carboxyméthylcellulose : les résultats obtenus après 48 heures d'incubation sont pratiquement identiques, même nombre de plages primaires, quelle que soit la composition du milieu d'entretien. Il y a ensuite apparition des plages satellites adjacentes aux primaires. Au-delà de 72 heures, des plages secondaires se forment à distance sur des nappes ayant reçu du milieu liquide. Lorsque les conditions optimales sont réunies pour permettre au processus de formation des plages primaires d'aboutir dans les 48 heures, l'emploi du milieu liquide n'a aucun incident fâcheux.

Nous n'avons dû ajouter du carboxyméthylcellulose dans le milieu d'entretien que lors des essais de titrages sur des nappes de cellules âgées de 3 à 5 jours, afin d'empêcher la formation à distance des plages secondaires.

Effet cytotoxique des sérums de dromadaires

L'examen des sérums naturels des dromadaires a révélé, au cours de nos essais, la présence de substances cytotoxiques vis-à-vis des cellules IB-RS₂, même après leur décomplémentation à 56 °C pendant 30 min. Ces effets néfastes sont devenus négligeables après une dilution au 1/4, pour la majorité d'entre eux. Certains sérums

ont dû cependant être absorbés en plus avec des cellules IB-RS₂, pendant 1 heure à 37 °C.

Application de la méthode de séroration de plages en milieu liquide

Notre méthode de séroration de plages en milieu liquide sur des cellules IB-RS₂ a été mise en œuvre pour le titrage de 57 sérums de dromadaires du Niger. Ils ont été prélevés sur des sujets âgés de 2 à plus de 20 ans. Aucun n'a été effectué sur des chamelons plus jeunes ou sur des adultes âgés entre 15 et 19 ans.

Parmi les sérums positifs, on a trouvé des titres variant de 1/4 à 1/64 par 0,10 ml, soit de 1/40 à 1/640 par millilitre de sérum.

TABL. N°1-Pourcentage de sérums positifs de dromadaires

Dilutions	Pourcentage de sérums positifs
1/40	17,54
1/80	26,31
1/160	12,28
1/320	12,28
1/640	7,01
1/1280	0

Quatorze sérums (24,26 p. 100) sont soit négatifs, soit inférieurs à 1/40.

Entre 3 et 14 ans, il existe aussi bien des sérums faiblement positifs (inférieurs à 1/40) que très fortement positifs (1/640).

Chez les animaux âgés de 20 ans et plus, les sérums positifs ne dépassent pas la dilution à 1/40.

Aucune corrélation significative entre le sexe de l'animal et son titre d'anticorps n'a pu être mise en évidence, sur ce faible nombre de sérums examinés.

COMMENTAIRES

La méthode de séroration de plages en milieu liquide, en permettant la détection de faibles titres d'anticorps, a mis en évidence un plus grand nombre de sérums positifs que la méthode de séroneutralisation totale. La sensibilité des cellules IB-RS₂ et VERO (10, 16, 18) vis-à-vis du virus de la variole des dromadaires a exempté l'usage coûteux d'œufs embryonnés. La possibilité d'employer du milieu liquide a beaucoup simplifié les manipulations. La régularité des résultats exige cependant certaines conditions : usage dans les 24-48 heures des tapis de cellules en culture ; absence d'inhibiteur non spécifique dans le milieu d'entretien ; arrêt du développement des plages primaires avant l'apparition des secondaires ; température d'incubation optimale.

Il existe chez les orthopoxvirus des virions extracellulaires, qui sont sortis normalement des cellules infectées et des virions intracellulaires libérables seulement par l'éclatement de ces cellules (1, 5, 21).

Les formes extracellulaires suscitent la formation des anticorps bivalents et efficaces contre ces deux formes. Au contraire, les anticorps induits par des virions intracellulaires ne neutralisent pas les extracellulaires.

Ces deux types d'anticorps coexistent chez un dromadaire qui a été infecté dans des conditions naturelles. On n'a pas besoin de les distinguer, lors des enquêtes sérologiques, pour la détection de cette maladie. Mais si l'on veut évaluer le titre des anticorps protecteurs après une campagne de vaccination, il serait raisonnable d'utiliser des virions extracellulaires dans les tests de séroration de plages, en se rappelant, toutefois, que l'immunité contre la variole des dromadaires est de nature mixte humoro-tissulaire.

RESUMEN

NGUYEN-BA-VY y RICHARD (D.). — Título de los anticuerpos contra el virus de la viruela de los dromedarios por el método de seroreducción de las placas sobre células IB-RS₂. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1986, **38** (3) : 223-228.

Se desarrolló y se utilizó un método de seroreducción de las placas, sobre células IB-RS₂ en medio líquido para el

título de los anticuerpos contra el virus de la viruela de los dromedarios.

Durante un ensayo, sobre 57 sueros de dromedarios del Niger, 43 se demostraron positivos con títulos variando de 1/40 a 1/640 por mililitro.

Palabras claves : Viruela del dromedario - Anticuerpos - Seroreducción de las placas - Células IB-RS₂.

BIBLIOGRAPHIE

1. APPELYARD (G.), HAPPEL (A. J.), BOULTER (E. A.). An antigenic difference between intracellular and extracellular rabbit poxvirus. *J. gen. Virol.*, 1971, **13** : 9-17.
2. ARDOIN (P.). Virus et technique virologique. Paris, éd. Maloine, 1983, p. 891.
3. BAXBY (D.), RAMYAR (H.), HESSAMI (M.), GHABOOSI (B.). Response of camels to intradermal inoculation with small pox and camel poxviruses. *Infect. Immun.*, 1975, **11** : 617-621.
4. BORISOVICH (Y. F.), OREKHOV (M. D.). Camel pox. *Veterinariya* (Moscou), 1966 (3) : 50-52. *Vet. Bull.*, 1966, **36** : 794. Abstr. n° 4739.
5. BOULTER (E. A.). Protection against poxviruses. *Proc. R. Soc. Med.*, 1969, **62** : 295.
6. CROSS (H. E.). The camels and its diseases. London, Bailliere, Tindal and Cox, 1917.
7. CURASSON (G.). Traité de pathologie exotique vétérinaire et comparée. Tome I. 2° éd., Paris, Vigot Frères, 1942.
8. CURASSON (G.). Le chameau et ses maladies. 2° éd., Paris, Vigot Frères, 1947.
9. CUTCHINS (E.), WARREN (J.), JONES (W. P.). The antibody response to small pox vaccination as measured by a tissue culture plaque method. *J. Immunol.*, 1960, **85** : 275-283.
10. DAVIES (F. G.), MUNGAI (J. N.), SHAW (T.). Characteristics of a Kenyan camel poxvirus. *J. Hyg. Camb.*, 1975, **75** : 381.
11. DE CASTRO (M. P.). Behaviour of the foot-and-mouth disease virus in cell culture, susceptibility of the IB-RS₂ cell line. *Archos Inst. biol. S. Paulo*, 1964, **31** : 63-78.
12. KITAMURA (T.), KITAMURA (Y.), KITAOKA (M.). Antibody response to small pox vaccination as expressed by plaque reduction on Hela cells. *Bull. O.M.S.*, 1964, **31** : 132-135.
13. KITAMURA (T.), SHINJO (N.). Assay of neutralizing antibody against variola virus by the degree of focus reduction on Hela cell cultures and its application to revaccination with small pox vaccines of various potencies. *Bull. O.M.S.*, 1972, **46** : 15-26.
14. KRIZ (B.). A study of camel pox in Somalia. *J. comp. Path.*, 1982, **92** : 1-8.
15. LEESE (A. S.). Two diseases of young camels. *J. trop. vet. Sci.*, 1909, **4** : 1-7.
16. MIRCHAMSY (H.), AHOURAI (P.). Comparative adaptation of some poxviruses in two cell systems. *Archs Inst. Razi*, 1971, **23** : 93-105.
17. NGUYEN-BA-VY et RICHARD (D.). Propriétés d'une souche de poxvirus isolée des dromadaires du Niger. (Article en préparation.)
18. RAMYAR (H.), HESSAMI (M.). Isolation, cultivation and characterization of camel poxvirus. *Archs Inst. Razi*, 1972, **24** : 13-21.
19. RICHARD (D.). Etude de la pathologie du dromadaire dans la sous-province du Borana (Ethiopie). Thèse doct. vét., E.N.V.A., Créteil 1975, n° 75, 181 pages.
20. RICHARD (D.), PLANCHENAU (D.). Projet de développement de l'élevage dans le Niger Centre-Est. Production cameline. Rapport de la deuxième mission, I.E.M.V.T., janvier 1982.
21. TURNER (G. S.), SQUIRES (E. J.). Inactivated small pox vaccine : immunogenicity of inactivated intracellular and extracellular vaccinia virus. *J. gen. Virol.*, 1971, **13** : 19-25.